

Praktikumsbericht

zum Praktikum beim Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

in der Arbeitsgruppe Gilberger (Malaria)

in Hamburg

vom 18.7. bis 12.08.2011

von Utz Ermel

Inhalt:

1. Einleitung
2. Projektinformationen
3. Material und Methoden
 - 3.1. PCR
 - 3.2. Agarose-Gelelektrophorese
 - 3.3. Aufreinigung enzymatischen Reaktionen
 - 3.4. Restriktionstrennung und Ligation
 - 3.5. Transformation von E.coli
 - 3.6. Screening mittels PCR und Gelelektrophorese
 - 3.7. Extraktion von Plasmid-DNA aus E.coli
 - 3.8. Sequenzierung
 - 3.9. BLAST-Suche und Alignment
4. Versuchsergebnisse
 - 4.1. Herstellung des Vektors
 - 4.2. Sequenz-Alignment
5. Diskussion
 - 5.1. Herstellung des Vektors
 - 5.2. Sequenz-Alignment
6. Fazit
7. Literaturverzeichnis
8. Anhang
 - 8.1. Legende

1. Einleitung

Schon seit ich mich mit den Vorgängen der Biochemie und Molekulargenetik beschäftige, finde ich es sehr spannend, wie selbst die kompliziertesten biologischen Vorgänge oder schönsten morphologischen Merkmale auf chemische Reaktionen und Abläufe zurückgeführt werden können. Daher habe ich mich sehr über die mir vom Förderverein der Biologieolympiade e.V. gegebene Möglichkeit eines Praktikums am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin gefreut, denn die Möglichkeit auf diesem Gebiet vor seinem Studium Erfahrungen zu sammeln ist für Schüler der 12. Klasse normalerweise nicht gegeben. Umso schwieriger war für mich ohne Praxiserfahrungen jedoch die Wahl der Arbeitsgruppe, die mir relativ frei gestellt wurde. Schlussendlich wählte ich eine der beiden Malariaforschungsgruppen aus, da ich mir über das Ausmaß der Verbreitung bewusst war und gerne mehr über den Stand der Forschung lernen wollte.

Die Arbeitsgruppe Malaria II unter Leitung von Tim Gilberger, in der ich mein Praktikum absolvierte beschäftigt sich mit dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum*. Vornehmlich wird dabei die Invasion der Merozoiten-Stadien der Erreger in die Blutzellen und die dafür verantwortlichen Proteine und Vorgänge untersucht. Außerdem steht die Untersuchung von Proteintransport und -lokalisierung, sowie die Erforschung posttranskriptioneller Modifikationen an Proteinen, sowie die Veränderungen in der Wirtszelle durch den Erreger im Mittelpunkt der von der Gruppe bearbeiteten Themen.

Ich selbst sollte mit meinem Praktikumsbetreuer zusammen aus einem vorhandenen Plasmid, der schon in transfizierten Malariaerregern zum Einsatz kam einen neuen Plasmid der neue Selektions- und Fluoreszenzeigenschaften codieren sollte, herstellen. Außerdem fertigte ich während meines Praktikums eine Analyse über Sequenzübereinstimmungen in einem bestimmten für die Endocytose wichtigen Protein für mehrere Organismen durch und erstellte eine veranschaulichende Grafik. Die erste Aufgabe konnte ich aufgrund einiger Fehler und daraus resultierenden Verzögerungen nicht beenden.

2. Projektinformationen

Malaria ist eine der am weitesten verbreiteten Krankheiten überhaupt und verursacht jedes Jahr den Tod vieler Menschen. Daher ist es ein Anliegen der Forschung Malariaerkrankungen zu heilen oder bestenfalls, zum Beispiel durch eine Impfung, vorzubeugen. Dazu müssen jedoch zuerst die biochemischen Mechanismen der Infektion und des Krankheitsverlaufs insgesamt verstanden werden. Diese Aufgabe verfolgt die Arbeitsgruppe, in der ich mein Praktikum absolvierte.

Während einer Malariaerkrankung durchläuft der Patient einen Zyklus. Daraus resultieren auch die regelmäßigen Fieberschübe. Zu einem bestimmten Zeitpunkt, versuchen die Merozoitenstadien der Malariaerreger in rote Blutzellen einzudringen, in denen sie unter Verbrauch des Hämoglobins wachsen. Ist das Wachstum weit genug fortgeschritten, so teilen sich die Erreger in der Zelle und verursachen durch Zerstörung des Blutkörperchens ihre Freisetzung oder gehen in ein geschlechtliches Stadium über, das für die Wiederaufnahme in einen Überträger wie die Anophelesmücke gebildet wird. Die von den Blutzellen freigesetzten Merozoiten beginnen den Kreislauf von vorn. Bei manchen *Plasmodium*-Arten verläuft dieser Zyklus zeitlich relativ konstant, es können also mit einer Behandlung zum richtigen Zeitpunkt mit großer Wahrscheinlichkeit alle Erreger getötet werden, wenn sie sich gerade im freien Merozoiten-Stadium befinden. Bei *Plasmodium falciparum* ist diese zeitliche Konstanz nicht gegeben, daher würden bei einer Behandlung nie fast alle Erreger im Merozoiten-Stadium,

sondern viele auch in Blutzellen (Trophozoiten) vorliegen und so vor der Behandlung geschützt werden. Außerdem kann ein Plasmodium-befall auch nach Jahren wieder durch Einlagerungen in Leberzellen aufflammen. Deshalb ist es wichtig zu erforschen, welche Veränderungen der Erreger an seinen Wirtszellen vornimmt, woran sie also zu erkennen sind, welche Proteine daran beteiligt sind und wie die Ernährung und das Wachstum in den Wirtszellen erfolgt, um Ansatzpunkte für Behandlungsmethoden zu finden.

Das Plasmid, das ich herstellen sollte sollte als Vektor für die Analyse der Lokalisation bestimmter Proteine dienen. Um mehrere Proteine gleichzeitig und ihr Zusammenspiel zu untersuchen, sollte das Plasmid für andere Fluoreszenzeigenschaften codieren. Um nur Zellen selektieren zu können, die beide Vektoren aufgenommen hatten, musste außerdem die Information für eine neue Resistenz eingeführt werden. Meine Arbeit ist also in das Fach der Molekulargenetik einzuordnen.

Außerdem erstellte ich eine Sequenzübereinstimmungsanalyse des für die Aufnahme von Hämoglobin in die Zelle wichtigen EHD-Proteins von *Plasmodium falciparum* mit mehreren anderen Organismen.

3. Material und Methoden

Um bestimmte DNA-Sequenzabschnitte in das Plasmid einzubringen benötigt man zunächst viele Kopien des gewünschten Abschnitts. Um diese Kopien herzustellen musste ich bestimmte Ausgangsmaterialien zunächst mit einer PCR vervielfältigen. Die danach folgenden Schritte sind hier chronologisch aufgeführt und mussten für jeden Abschnitt nacheinander durchgeführt werden.

3.1 PCR

Für die PCR benötigte ich für jeden Ansatz die vorher bestellten sequenzspezifischen Primer (jeweils 1 µl), den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt (2 µl), die Polymerase (2 µl), dNTPs (2 µl), 10fach-Polymerase-Puffer (2 µl) und 10 µl dest. Wasser. Je nach Anzahl der gleichzeitig laufenden PCRs wird ein Mastermix erstellt aus dem dann jeweils 20 µl abgenommen werden. Die Annealing- und Elongationsdauer wird auf die Länge der Abschnitte angepasst.

3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Gelelektrophorese kann überprüft werden, ob die durchgeführte PCR erfolgreich war und der richtige Abschnitt vervielfältigt wurde bzw. vorher vorhanden war. Bei diesem Verfahren wird die DNA der Größe nach geordnet. Um das dafür erforderliche Gel herzustellen wird eine 1%ige Agarose-Lösung mit TAE-Puffer hergestellt. Diese wird in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und in eine Gussform, die vorher mit entsprechenden Kämmen präpariert wurde, gegossen. Nach dem Aushärten wird das Gel in eine Ethidiumbromid-TAE-Lösung gelegt. Nach ausreichender Einwirkzeit wird das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gelegt. Jeweils 1 µl der aufzutrennenden Substanz wird zusammen mit 1 µl Loading Dye und 4 µl Wasser werden in ein Fach auf dem Gel pipettiert. Links und rechts neben den aufgetragenen Proben werden 2 µl Längenstandard aufgetragen. Anschließend wird die Kammer verschlossen und eine Spannung von 60 V angelegt. Nach 20-30 Minuten kann das Gel aus der Kammer genommen werden. Unter UV-Licht werden die DNA-Banden aufgrund der Ethidiumbromidfärbung sichtbar. Mittels des

Längenstandards kann das Ergebnis mit den vorausgesagten Längen der Abschnitte verglichen werden.

3.3 Aufreinigung nach enzymatischen Reaktionen

Die Aufreinigung von den PCR-Produkten erfolgte mit einem DNA-Purification-Kit der Firma QIAGEN®. Nach dem gleichen Protokoll wurden auch Restriktionstrennungen und andere enzymatische Reaktionen aufgereinigt. Dazu wird eine Säule, die eine Membran beinhaltet, an die sich DNA in wässriger Lösung besonders stark bindet auf ein Sammelgefäß gesteckt. Das verdünnte PCR-Produkt wird auf die Säule gegeben und bei 11000 x g 30-60 s zentrifugiert. Die Flüssigkeit im Sammelbehälter wird verworfen. Anschließend wird die Säule mit 0,75 ml Waschpuffer gefüllt und erneut 30-60 s bei 11000 x g zentrifugiert. Der Waschpuffer wird verworfen. Danach wird 1 min. bei 11000 x g zentrifugiert, um letzte Reste des Waschpuffers zu entfernen. Das Sammelgefäß kann danach weggeworfen werden und wird durch ein 1,5 ml Reaktionsgefäß ersetzt. Mit 50 µl Elutionspuffer wird nach 1 min Einwirkzeit die DNA durch Zentrifugation für 1 min bei 11000 x g eluiert.

3.4 Restriktionstrennung und Ligation

Mit Restriktionsenzymen kann man DNA an bestimmten palindromischen Abschnitten schneiden. Dadurch können DNA-Abschnitte entfernt werden. Mit der DNA-Ligase können später an diesen Stellen neue Sequenzen mit den selben Schnittstellen eingebunden werden bzw. das Plasmid wieder zu einem Ring geschlossen werden. Der Restriktionsansatz besteht aus jeweils 1 µl der beiden Enzyme, 5 µl darauf abgestimmtem Puffer (enzymabhängig), 10 µl DNA-Probe und bei Bedarf 2 µl BSA. Das Gemisch wird mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Danach wird nach der unter 3.3 beschriebenen Methode aufgereinigt.

Anschließend kann mit dem Produkt eine Ligation erfolgen. Dazu werden 2 µl Plasmid, 3 µl des einzufügenden DNA-Abschnitts, 2 µl 10fach Ligase-Puffer, 12 µl Wasser und 1 µl Ligase in ein Reaktionsgefäß gegeben und bei 37°C für 1h inkubiert. Mit dem Produkt kann nun eine Transformation durchgeführt werden.

3.5 Transformation von E. coli

Zur Vervielfältigung des Vektors muss dieser von E. coli aufgenommen und repliziert werden. Dazu müssen kompetente Zellen verwendet werden, die mit CaCl₂ behandelt wurden. In ein vorbereitetes Reaktionsgefäß werden zu der Zellsuspension 2 µl des DNA-Materials gegeben. Die Gefäße werden für 5 min in Eis inkubiert und anschließend für 45 s auf einen 42°C warmen Heizblock gestellt. Nach diesem Hitzeschock erfolgt erneut eine Inkubation in Eis für 5 min. Anschließend wird zu den Zellen 800 µl LB-Medium hinzugegeben und die Gefäße 60 min bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der 60 min werden die Gefäße kurz zentrifugiert um die Zellen auf dem Boden zu konzentrieren. Das überstehende LB-Medium wird verworfen und die Zellen auf eine ampicillinhaltige LB-Agarplatte aufgebracht. Auf dieser Platte werden sie mittels kleiner Glasskugeln (beads) verteilt. Die Platte wird über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag muss ein Screening durchgeführt werden, um die Kolonien herauszufinden, die auf ein transformiertes Bakterium zurückgehen.

3.6 Screening mittels PCR und Gelelektrophorese

Um die Kolonien herauszufinden, die das neue Plasmid enthalten wird eine Screening-PCR durchgeführt. Dazu werden von der nach der Transformation inkubierten Platte alle Kolonien mit jeweils einer Pipettenspitze auf eine weitere LB-amp-Platte aufgebracht, die vorher nummeriert wurde. Anschließend wird jede Pipettenspitze in das entsprechend nummerierte, vorher mit PCR-Ansatz gefüllte PCR-Reaktionsgefäß gesteckt. Nach der Überführung aller Kolonien auf die nummerierte Platte wird diese bei 37°C inkubiert und die in der

Pipettenspitze enthaltenen Zellen mit dem PCR-Ansatz durch leichtes Pipettieren vermischt. Die Primer für die darauffolgende PCR sind so gewählt, dass sie die neu in den Vektor eingebrachte Sequenz amplifizieren. In der Auswertung der Gelelektrophorese, die mit dem PCR-Produkt angefertigt wird, können nun die Nummern ausgewählt werden, bei denen deutlich ersichtlich ist, dass das erwünschte Produkt amplifiziert wurde. Mittels jeweils einer Pipettenspitze werden nun 5 ml LB-amp Flüssigkulturen mit den Kolonien der gewählten Nummern angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Rüttler inkubiert. Diese angezüchteten Bakterien dienen nun zur Extraktion des Plasmids.

3.7 Extraktion von Plasmid-DNA aus E.coli

Zur Extraktion der Plasmid-DNA aus den angezüchteten Flüssigkulturen wurde ein Miniprep-Kit der Firma QIAGEN® verwendet. Durch 15 minütige Zentrifugation des Flüssigmediums bei 6000 x g und 4°C wird ein Bakterienpellet auf dem Grund des Reaktionsgefäßes gebildet. Dieses wird nach dem Verwerfen des LB-Mediums in 250 µl P1-Puffer gelöst. Anschließend wird 250 µl P2-Puffer hinzugefügt, durch 4-6 maliges Invertieren mit der Flüssigkeit vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit werden 350 µl N3-Puffer hinzugefügt, sofort durch 4-6 maliges invertieren vermischt und 5 min in Eis inkubiert. Danach wird die Lösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei höchstmöglicher Geschwindigkeit für 10 min zentrifugiert und die danach überstehende Flüssigkeit in eine Säule überführt, die eine Membran enthält, die Plasmid-DNA binden kann. Die Säule wird mit einem Auffanggefäß 60s bei höchstmöglicher Geschwindigkeit zentrifugiert. Die durchgeflossene Flüssigkeit wird verworfen. Anschließend wird die Säule mit 0,5 ml PB-Puffer und 0,75 ml PE-Puffer durch jeweils einminütiges Zentrifugieren gewaschen und danach durch 1 min weiterer Zentrifugation getrocknet. Um das Plasmid zu eluieren werden 50 µl EB-Puffer auf die Säule gegeben und nach 1 min Wartezeit in 1 min in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert. In den hergestellten Plasmid können nun weitere DNA-Abschnitte kloniert werden. Vorher sollte jedoch eine Sequenzierung durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob die Transformation tatsächlich zufriedenstellend funktioniert hat.

3.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde durch einen Sequenzierungsservice nach der Sequenzierungsmethode nach Sanger durchgeführt. Dafür mussten jeweils ein Ansatz, der den reverse- und ein Ansatz der den forward-Primer des in das Plasmid gebrachten DNA-Abschnitts und das zu sequenzierende Plasmid enthalten. Die Auswertung erfolgte mittels eines Elektropherogramms.

Nach der Klonierung aller gewünschten DNA-Abschnitte in das Plasmid hätte nun eine größere Menge des Plasmids hergestellt werden können und eine Transfektion in die Malariaerreger stattfinden können. Diesen Schritt konnte ich leider nicht ausführen.

3.9 BLAST-Suche und Alignment

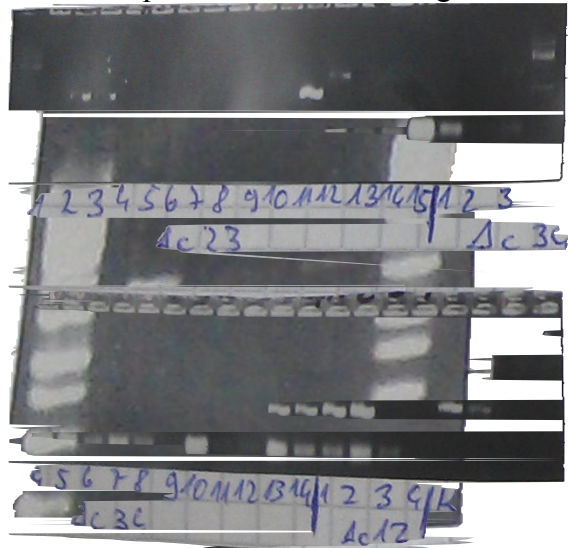
Neben der praktischen Arbeit im Labor erstellte ich außerdem eine Übereinstimmungsanalyse der Sequenz eines Proteins bei 45 verschiedenen Organismen ausgehend von der Sequenz von *Plasmodium falciparum*. Dazu suchte ich mittels einer blastp-Suche in mehreren Datenbanken nach Proteinen mit übereinstimmenden Sequenzen. Mittels eines Sequenz-Alignment-Tools erstellte ich aus den Ergebnissen ein Dendrogramm, in dem die Übereinstimmung dargestellt wird.

4. Versuchsergebnisse

4.1 Herstellung des Vektors

Leider konnte ich die Herstellung des Vektors nicht zu Ende führen. Aufgrund von Fehlern in der Ausführung einiger Arbeitsschritte, einem anfänglich falschen Primerdesign und sonstigen Verzögerungen konnte ich die mir gestellte Aufgabe nicht erfüllen. Eine Auflistung aller Zwischenergebnisse halt ich für sinnlos. Daher werde ich hier Beispielhaft einige Abbildungen meiner Ergebnisse präsentieren.

Gelelektrophorese eines Screenings

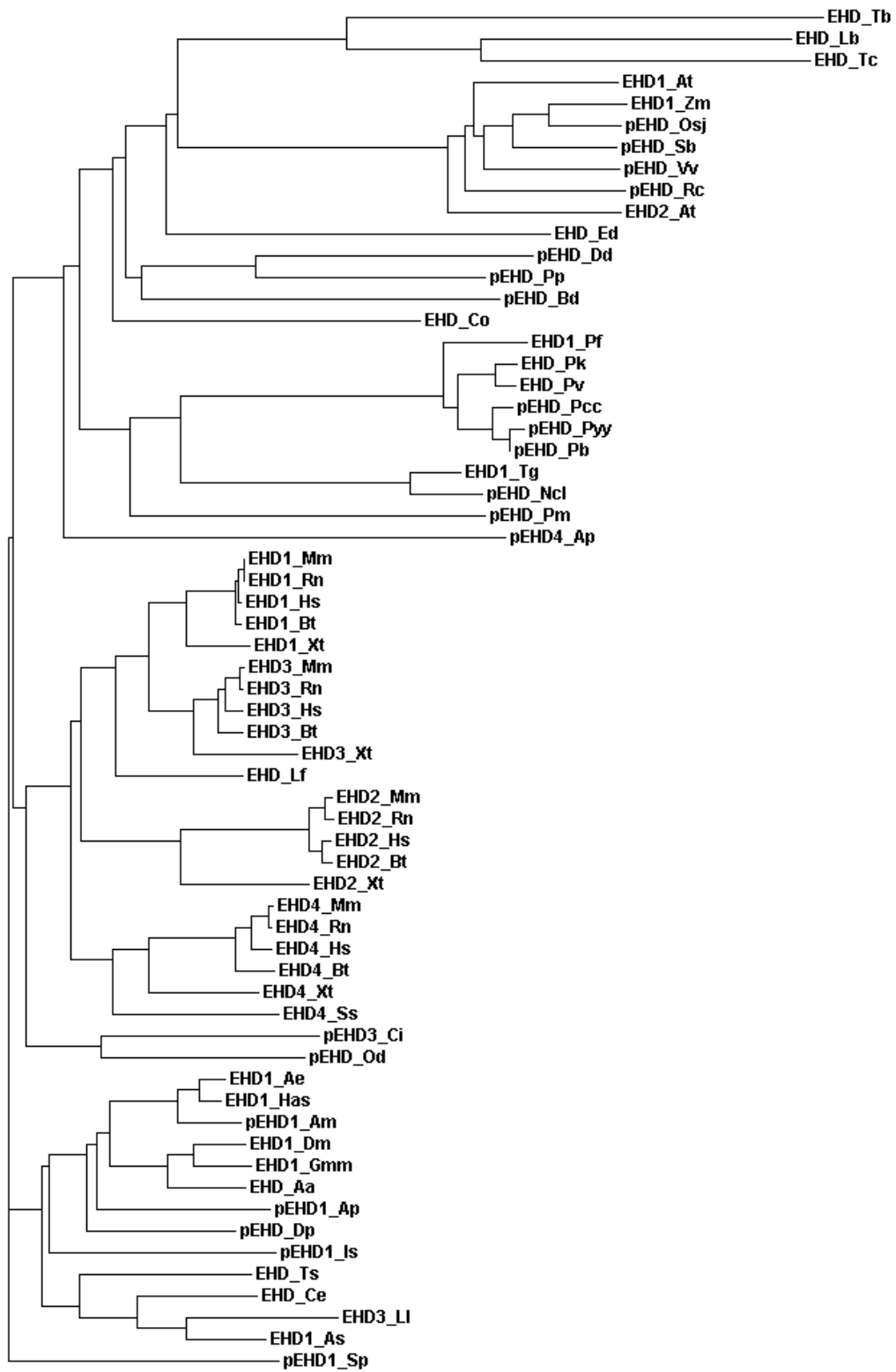


Aufnahme einer Gelelektrophorese

4.2 Sequenz-Alignment

Durch ein Alignment mit dem Algorithmus ClustalW2 bin ich zu folgender Darstellung gekommen, die die Ergebnisse zusammenfasst. Die Legende für die verwendeten Abkürzungen

ist ebenfalls im Anhang einzusehen (8.1).



5. Diskussion

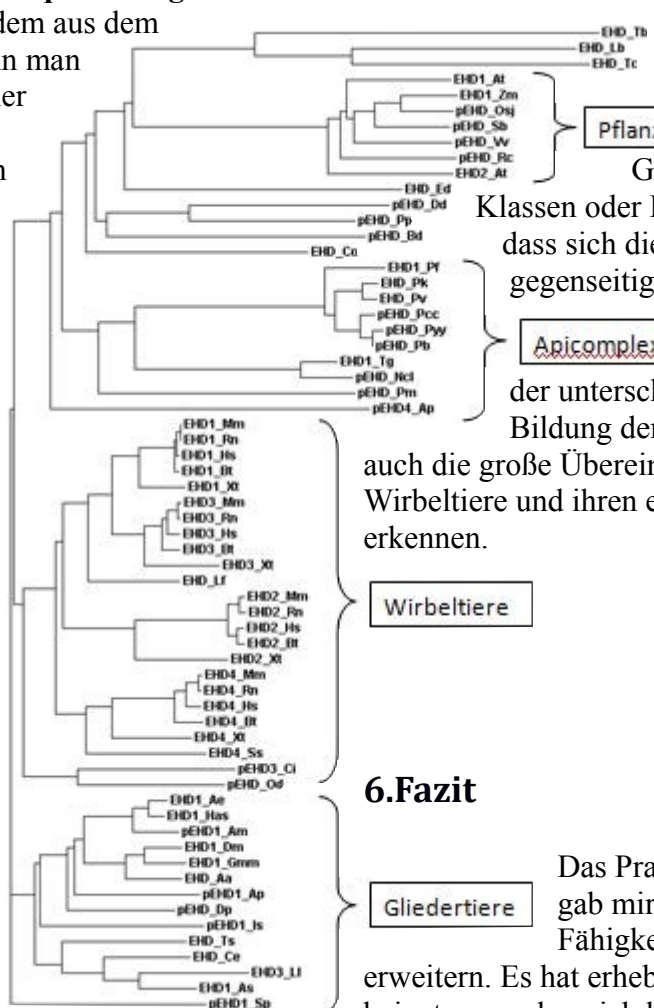
5.1 Herstellung des Vektors

Bei den zwei gezeigten Aufnahmen handelt es sich um Fotos von mit UV-Licht bestrahlten Agarose-Gelen. Das erste Bild zeigt das Ergebnis einer Screening-PCR. Es ist sichtbar, dass nicht in allen Proben DNA amplifiziert wurde. Das heißt, in diesen Kolonien hat die Transformation nicht funktioniert. Nur in den Proben, die in der Elektrophorese eine Bande zeigten, war der neue DNA-Abschnitt enthalten und konnte demzufolge bei der PCR amplifiziert werden. Im weiteren Verlauf meiner Arbeit wurden diese Kolonien gewählt und zur Vermehrung des Plasmids eingesetzt.

Auf dem Bild rechts ist eine einfache Gelelektrophorese dargestellt. Die Länge des zu amplifizierenden Stücks war ungefähr 1800 bp. In der ersten und der dritten Probe ist es anscheinend enthalten.

5.2 Sequenz-Alignment

In dem aus dem kann man näher sich



Alignment erstellten Dendrogramm erkennen, dass sich die Sequenzen verwandter Arten auch wie zu erwarten stärker ähneln. So bilden Gruppen, die man klar bestimmten

Klassen oder Reichen zuordnen kann. Interessant ist, dass sich die verschiedenen EHD-Proteine gegenseitig stärker ähneln als die EHD-Proteine einer Art zueinander. Daraus lässt sich schließen, dass die Entstehung der unterschiedlichen Proteine schon vor der Bildung der Arten geschah. Außerdem kann man

auch die große Übereinstimmung zwischen den Sequenzen Wirbeltiere und ihren evolutionären Vorfahren den Tunicaten erkennen.

6. Fazit

Das Praktikum hat mir sehr gut gefallen und gab mir die Möglichkeit meine praktischen Fähigkeiten zu trainieren und mein Wissen zu erweitern. Es hat erheblich zur Wahl meines Studienfachs beigetragen, denn ich kann nun sehr gut einschätzen was auf

mich zukommt. Außerdem hat mir das Praktikum gezeigt, dass man als Forscher auch mit Rückschlägen zurechtkommen muss und mir ein bisschen Zeit gegeben die Stadt Hamburg kennenzulernen.

Während meiner Praktikumszeit fand ich die Atmosphäre im Labor sehr angenehm und die Arbeit machte mir großen Spaß, daher möchte ich mich an dieser Stelle auch bei meiner

Arbeitsgruppe, allen voran meinem Betreuer Florian Kruse und dem Leiter der Laborgruppe Dr. Tobias Spielmann bedanken, die mir diese Erfahrung ermöglichten. Obgleich fühlte ich mich vom Institut nach Ende meines Praktikums etwas hintergangen, da Dinge über mich behauptet wurden, über die mit mir nie persönlich abgesprochen wurden.

Auch beim Förderverein der Biologieolympiade möchte ich mich für die Bereitstellung des Praktikumsplatzes bedanken und mich für etwaige Nachteile, die durch meine Teilnahme für den Verein entstanden sind entschuldigen, obwohl auch hier meiner Meinung nach die Kommunikation verbessert werden sollte.

7.Literaturverzeichnis

Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, et al., *Malaria: progress, perils, and prospects for eradication*. J Clin Investig (2008)

8.Anhang

8.1 Legende zum Sequenz-Alignment

Der Präfix p- vor der Bezeichnung EHD_[...] steht für Proteine mit dem Attribut predicted oder putative.

Aa - *Aedes aegypti*
Ae - *Acromyrmex echinatior*
Am - *Apis mellifera*
Ap - *Acyrtosiphon pisum*
As - *Ascaris suum*
At - *Arabidopsis thaliana*
Bd - *Batrachochytrium dendrobatidis*
Bt - *Bos Taurus*
Ce - *Caenorhabditis elegans*
Ci - *Ciona interstitialis*
Co - *Capsaspora owczarzaki*
Dd - *Dictyostelium discoideum*
Dm - *Drosophila melanogaster*
Dp - *Daphnia pulex*
Ed - *Entamoeba dispar*
Gmm - *Glossina morsitans morsitans*
Has - *Harpegnathos saltator*
Hs - *Homo sapiens*
Is - *Ixodes scapularis*
Lb - *Leishmania brasiliensis*
Lf - *Lampetra fluviatilis*
Ll - *Loa loa*
Mm - *Mus musculus*
Ncl - *Neospora caninum* Liverpool
Od - *Oikopleura dioica*
Osj - *Oryza sativa Japonica Group*
Pb - *Plasmodium berghei*
Pcc - *Plasmodium chabaudi chabaudi*
Pf - *Plasmodium falciparum*
Pk - *Plasmodium knowlesi*
Pm - *Perkinsus marinus*
Pp - *Polysphondylium pallidum*
Pv - *Plasmodium vivax*
Pyy - *Plasmodium yoelii yoelii*
Rc - *Ricinus communis*
Rn - *Rattus norvegicus*
Sb - *Sorghum bicolor*
Sp - *Strongylocentrotus purpuratus*
Ss - *Salmo salar*
Tb - *Trypanosoma brucei*
Tc - *Trypanosoma cruzi*
Tg - *Toxoplasma gondii* ME49
Ts - *Trichinella spiralis*
Vv - *Vitis vinifera*
Xt - *Xenopus tropicalis*
Zm - *Zea mays*